

Evaluation and optimization of laboratory criteria for Antiphospholipid Syndrome Diagnosis

Citation for published version (APA):

Yin, D. (2021). *Evaluation and optimization of laboratory criteria for Antiphospholipid Syndrome Diagnosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20211027dy>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20211027dy](https://doi.org/10.26481/dis.20211027dy)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Het antifosfolipidensyndroom (APS) wordt gediagnosticeerd wanneer een patiënt lijdt aan een trombose of zwangerschapsmorbiditeit met de persistente aanwezigheid antifosfolipidenantilichamen (aFLs) ¹. Aangezien vasculaire trombose en zwangerschapsgerelateerde morbiditeit vaak voorkomen in de algemene bevolking en niet altijd gerelateerd zijn aan APS, hangt de diagnose van APS voornamelijk af van de laboratoriummethode die gebruikt wordt voor de bepaling van aFLs. Doordat patiënten met APS vaak een intensievere antistollingstherapie nodig hebben, rust er een zware last op de testen die worden gebruikt om de aanwezigheid van circulerende aFLs te detecteren.

Laboratoriumdiagnose van APS: de huidige problemen

De huidige herziene laboratoriumcriteria voor APS-classificatie bestaan uit een combinatie van verschillende laboratoriumtesten om aFLs te detecteren. Deze laboratoriumcriteria omvatten één functionele stollingstest die bekend staat als lupus anticoagulans (LAC), en twee immunologische testen die immunoglobuline (Ig) G en/of IgM meten met bèta2-glycoproteïne I (antiβ2GPI) als antigeen, de anticardiolipin antistofstest en de anti- β2GPI antistof test. Om vals-positieve testen door infecties te voorkomen, moeten positieve testen worden herhaald met een interval van ten minste 12 weken ¹.

Momenteel vertoont de detectie van aFLs grote verschillen tussen de verschillende assays en tussen de laboratoria^{2,3}. Er zijn namelijk problemen bij de standaardisatie van deze testen, wat de laboratoriumdiagnose van APS moeilijker maakt. De huidige criteria voor de detectie van aFLs betreft een heterogene populatie antilichamen. Het is nog niet bekend welke eiwitten en factoren bijdragen aan de productie van aFLs en hoe deze antilichamen trombose en zwangerschapsmorbiditeit kunnen veroorzaken. Daarom moet er op verschillende manieren worden onderzocht of een nieuwe aFLs-assay mogelijk nuttig kan zijn bij de diagnose van APS: ten eerste moet men aantonen dat de antilichamen pathogeen zijn in APS-diermodellen, ten tweede moeten de antilichamen een sterke associatie vertonen met de klinische manifestaties van APS (trombose of zwangerschapscomplicaties). Als dit volstaan is, dan kan het gebruik van deze testen niet alleen de diagnose van APS verbeteren, maar zou het ook kunnen helpen bij de risicostratificatie van de patiënten.

Is er een toegevoegde waarde van het detecteren van anti-domein I van β2GPI IgG bovenop de huidige APS laboratoriumcriteria?

De antilichamen gericht tegen het eerste domein (DI) van β2GPI blijken pathogeen te zijn in een diermodel^{4,5}. DI bevat een belangrijk pathogeen epitoom (G40-R43) dat cryptisch is en alleen

wordt blootgesteld wanneer β 2GPI zich in zijn open conformatie bevindt ⁶⁻⁸. Er is een hoge variatie aan blootstelling van dit epitoom in de anti- β 2GPI IgG-assays, waardoor er DI-reactieve stalen gemist worden in deze assays ³.

Klinische rol van antiDI-assays

Recent zijn er testen ontwikkeld die specifiek antiDI-antilichamen detecteren. Echter, er is nog geen consensus bereikt over de toegevoegde waarde van antiDI-antilichamen in de classificatiecriteria van APS (**hoofdstuk 2**). Sommige onderzoeken toonden een hogere correlatie aan met trombose, terwijl andere geen toegevoegde waarde van antiDI-assays konden bewijzen. Van alle testen die antiDI IgG detecteren, was het vooral de tweestaps antiDI-ELISA die aanzienlijk hogere Odd Ratio's (OR's) voor antiDI IgG vertoonde dan de antilichamen die gericht zijn op andere domeinen van het eiwit. De chemiluminescentie-immunoassay (CLIA) is momenteel de meest gebruikte methode om antiDI IgG antilichamen te detecteren. AntiDI IgG gemeten door CLIA blijken te correleren met de klinische manifestaties van APS, maar de toegevoegde klinische waarde is echter niet consistent. Sommige studies konden wel de toegevoegde waarde van antiDI aantonen, terwijl andere studies niet. Geen van de overige drie assays, namelijk de directe antiDI ELISA, de competitieve inhibitie ELISA en de commercieel ontwikkelde INOVA antiDI ELISA, kon een toegevoegde waarde van antiDI IgG aantonen in vergelijking met de andere anti β 2GPI IgG antilichamen. De inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan verschillen in niet-assay gerelateerde factoren (zoals verschillende onderzoekspopulaties en, behandelingsprotocollen), maar ook aan factoren die verband houden met de methodologie om antiDI, antiCL en anti- β 2GPI antilichamen te detecteren.

Detectie van antiDI IgG door CLIA

Op basis van de literatuurreresultaten hebben we data van een multicenter studie gebruikt om te onderzoeken of er een meerwaarde is van het meten van antiDI-antilichamen met de CLIA aanvullend op de huidige APS-classificatiecriteria. Dit werd getest bij een grote cohort van APS- en niet-APS-patiënten, waarbij er dan ook gekeken werd naar antiCL en anti β 2GPI die gemeten werden met vier verschillende commercieel beschikbare assays (**hoofdstuk 3**). In deze multicenterstudie vonden we dat de detectie van antiDI IgG door CLIA minder gevoelig, maar wel specifiek was in vergelijking met de huidige laboratoriumcriteria aFL-tests. Dit resulteerde in een hogere OR voor trombose en zwangerschapsmorbiditeit. Bovendien zijn anti-DI IgG voornamelijk aanwezig bij triple-positieve patiënten met een hoog risico en die ook hogere concentraties aFL's vertonen. Bovendien geeft de combinatie van antiDI antilichamen met een drievoudige positiviteit een hoger risico op klinische symptomen dan alleen drievoudige positiviteit. Echter, in tegenstelling tot onze verwachting, verbeterde de toevoeging van antiDI of de vervanging van anti β 2GPI IgG door antiDI, de OR's voor trombose of zwangerschapsmorbiditeit nauwelijks. Daarom kon onze studie geen toegevoegde waarde aantonen van het meten van antiDI IgG bovenop de huidige laboratoriumcriteria. Dit bleek ook onafhankelijk te zijn van type assay dat gebruikt werd om antiCL en anti β 2GPI antilichamen te meten. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat de CLIA assay een verminderde blootstelling heeft van het pathogene DI-epitoom, wat mogelijk implicaties geeft voor de juiste patiënt classificatie ³.

In **hoofdstuk 1** hebben we het belang aangetoond van het gebruik van een hydrofiel oppervlak om β 2GPI op te coaten, waardoor de conformationele verandering wordt geïnduceerd die resulteert in de blootstelling van het cryptisch pathogeen epitoom op DI van β 2GPI. Zoals hierboven beschreven, blijken de antilichamen die gericht zijn tegen het cryptische epitoom G40-R43 op DI pathogeen te zijn in vivo en vitro studies. De resultaten die met anti β 2GPI-assays worden verkregen, zijn dus afhankelijk van de conformatie van het gecoate β 2GPI (d.w.z. de blootstelling van het epitoom G40-R43). Dit wordt dus beïnvloed door het type oppervlak dat gebruikt wordt om β 2GPI te immobiliseren. Aangezien in antiDI-assays DI wordt gecoat in plaats van het volledige β 2GPI eiwit, werden vergelijkbare problemen met deze assay niet verwacht. Echter, dient er ook rekening te worden gehouden met de positieve lading van het epitoom G40-R43. Hierdoor kan de lading van het coatingoppervlak mogelijk ook de beschikbaarheid van het G40-R43 epitoom beïnvloeden. Er wordt namelijk verondersteld dat het gebruik van een neutraal coatingsoppervlak resulteert in een willekeurige oriëntatie van DI, en dus ook in de blootstelling van epitoom G40-R43. Maar wanneer men een negatief oppervlak gebruikt, dan gaat het positieve epitoom daarop binden, waardoor het niet beschikbaar is voor de antilichamen. Bij de CLIA-assay kan een mogelijke lading van de gebruikte beads niet worden uitgesloten, waardoor de blootstelling van het epitoom G40-R43 onzeker is. Om dit na te gaan hebben we twee monoklonale antilichamen (P1-117 en P2-6) gebruikt in de CLIA. Antilichaam P1-117, dat epitoom G40-R43 herkent, kan alleen binden op DI wanneer β 2GPI zich in zijn open conformatie bevindt, terwijl P2-6 DI herkent ongeacht de conformatie van β 2GPI⁹. Onze data toonden aan dat P2-6 kon worden gedetecteerd, terwijl er geen signaal werd verkregen voor P1-117 in deze antiDI CLIA. In tegenstelling tot de verwachting, is het epitoom G40-R43 in deze antiDI-assay niet beschikbaar, waardoor patiëntenstalen met antilichamen die het epitoom G40-R43 herkennen dus worden gemist. De commercieel verkrijgbare antiDI CLIA detecteert dus antilichamen tegen DI, met uitzondering van de meer specifieke antiDI-antilichaampopulatie gericht tegen het epitoom G40-R43. Bovendien kwamen de resultaten van anti- β 2GPI en antiDI gemeten op hetzelfde platform met elkaar overeen, wat suggereert dat beide testen bijna dezelfde antilichaampopulatie meten die dus gericht zijn tegen DI, maar niet tegen het G40-R43-epitoom.

Detectie van antiDI IgG door een hydrofobe ELISA

Afgezien van de antiDI CLIA-assay, zijn er andere methoden beschikbaar om antiDI-antilichamen te detecteren. Al in 2005 gaf een in-huis ELISA aan dat het testen van antiDI IgG de identificatie mogelijk maakt van APS patiënten met het hoogste risico op het ontwikkelen van trombose of zwangerschapsmorbiditeit^{10,11}. Hierbij werd nogmaals bevestigd dat de juiste blootstelling van het G40-R43-epitoom van uitermate belang is¹¹. In deze ELISA word DI zowel op een hydrofiele ELISA-plaat, als een hydrofobe ELISA-plaat gecoat, wat resulteert in een verschil in blootstelling van het pathogene DI-epitoom.

In **hoofdstuk 4** hebben we deze in-huis test vergeleken met de commerciële antiDI CLIA in een groot cohort van APS- en niet-APS-patiënten. Wanneer DI werd gecoat op een hydrofiele plaat, werden er geen antilichamen gedetecteerd in alle stalen. Echter, wanneer DI op een hydrofobe plaat werd gecoat, konden de antilichamen wel worden gedetecteerd en waren de waarden van de optische dichtheid (OD) van de APS-stalen significant hoger dan die van de controlegroepen. Daarnaast hebben we vastgesteld dat 18 van de 66 stalen met trombose negatief waren met de

antiDI CLIA, maar positief met de in-huis antiDI hydrofobe ELISA. Dit resulteerde in een hogere gevoeligheid van de in-huis antiDI hydrofobe ELISA in vergelijking met de commerciële antiDI CLIA. Bovendien detecteerde de in-huis antiDI-hydrofobe ELISA meer stalen met klinische manifestaties van APS in vergelijking met de antiDI IgG-CLIA.

Samengevat suggereren deze resultaten dat de antiDI hydrofobe ELISA een meer specifieke antiDI-antilichaampopulatie kan meten die gericht is tegen G40-R43, vergeleken met de commercieel verkrijgbare antiDI CLIA die alle antilichamen tegen DI detecteert, met uitzondering van antilichamen gericht tegen het epitoom G40-R43. Onze gegevens benadrukken het belang van het meten van antistoffen gericht tegen het cryptische epitoom G40-R43, niet alleen in de anti β 2GPI-assays, maar ook in de antiDI-assays om er zeker van te zijn dat in ieder geval deze pathogene antilichaampopulatie niet wordt gemist.

Kortom, net als bij de anti β 2GPI-assay, is standaardisatie van antiDI-assays van het grootste belang. Deze standaardisatie omvat de bevestiging van een bevredigende blootstelling van het G40-R43 epitoom om er zeker van te zijn dat ten minste één specifieke pathogene antilichaampopulatie wordt gemeten. Hierbij is de lading van het oppervlak dat gebruikt wordt om DI te immobiliseren van belang, aangezien het de blootstelling van het G40-R43 epitoom kan beïnvloeden. Het is dus interessant om de blootstelling van dit epitoom in alle beschikbare antiDI-assays te verifiëren, wat ook de standaardisatie van antiDI-assays kan verbeteren.

Is er een meerwaarde om de IgA-isotype antiCL-antilichamen en anti β 2GPI-antilichamen in APS te detecteren?

De huidige criteria zeggen dat men IgG en IgM antiCL en anti β 2GPI moet detecteren om de diagnose van APS te bevestigen, en zijn de IgA antilichamen niet opgenomen in de huidige classificatiecriteria. In **hoofdstuk 6** onderzochten we of er een toegevoegde waarde is van het meten van antiCL en anti β 2GPI IgA antilichamen naast het huidige aFLs paneel bestaande uit LAC, antiCL en anti β 2GPI IgG/M. We vonden dat positiviteit voor antiCL en/of anti β 2GPI IgA antilichamen inderdaad geassocieerd was met trombose en zwangerschapsmorbiditeit. Echter, een geïsoleerde IgA positiviteit was zeldzaam en correleerde niet met klinische manifestaties van APS. Onze resultaten ondersteunen dus niet de meting van antiCL- en/of anti β 2GPI-IgA naast de conventionele aFLs bij het identificeren van patiënten met klinische manifestaties van APS.

Is een geïsoleerde LAC in afwezigheid van antiCL- en anti- β 2GPI-antilichamen klinisch relevant?

LAC detecteert een functioneel effect van een heterogene groep aFLs antilichamen. De klinische relevantie van een geïsoleerde LAC, in afwezigheid van antiCL en anti β 2GPI IgG en IgM, is discutabel. Daarom hebben we in **hoofdstuk 7** gekeken naar de correlatie van een geïsoleerde aanwezigheid van LAC met trombose, en dit vergeleken met triple positiviteit in een cohort van

APS- en niet-APS-patiënten. We ontdekten dat een geïsoleerde LAC een zwakkere LAC-activiteit vertoonde in vergelijking met triple positieve patiënten. Patiënten met een geïsoleerde LAC hebben echter een vergelijkbaar of zelfs hoger risico op trombose in vergelijking met patiënten met triple positiviteit. De aanwezigheid van anti-PS/PT-antilichamen kon de LAC-positiviteit niet verklaren in alle stalen met geïsoleerde LAC. Aangezien de stalen negatief waren voor antilichamen tegen β 2GPI en antiPS/PT zijn verdere studies nodig om het antigeen te identificeren dat verantwoordelijk is voor een geïsoleerde LAC.

Conclusie

De klinische symptomen van APS komen vaak voor, ongeacht het syndroom, waardoor de diagnose van APS moeilijk is en voornamelijk afhankelijk is van de laboratoriumcriteria. Momenteel is de laboratoriumdiagnose van APS nog steeds een uitdaging vanwege het gebrek aan standaardisatie en de heterogeniteit van aFLs-antilichamen. We toonden aan dat het belangrijk is om de juiste blootstelling van het cryptische epitoom in alle beschikbare antiDI-assays te verifiëren om de standaardisatie van de antiDI-assays te verbeteren. Bovendien was een geïsoleerde IgA zeldzaam en correleerde het niet met de klinische manifestaties van APS. Patiënten met een geïsoleerde LAC hebben echter een vergelijkbaar of zelfs hoger risico op trombose in vergelijking met patiënten met triple positiviteit. Verdere studies zijn nodig om de implicaties van onze bevindingen uit te werken.

References

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis* 2006; **4**(2): 295-306.
2. Favaloro EJ, Wheatland L, Jovanovich S, Roberts-Thomson P, Wong RC. Internal quality control and external quality assurance in testing for antiphospholipid antibodies: Part I—Anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibodies. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2012; **38**(04): 390-403.
3. Pelkmans L, Kelchtermans H, de Groot PG, et al. Variability in exposure of epitope G40-R43 of domain I in commercial anti-beta2-glycoprotein I IgG ELISAs. *PloS one* 2013; **8**(8): e71402.
4. Chiara Agostinis, Paolo Durigutto, Daniele Sblattero, et al. A non-complement-fixing antibody to beta 2 glycoprotein I as a novel therapy for antiphospholipid syndrome. *Blood* 2014; **123**(22): 3478-87.
5. Pericleous C, Ruiz-Limon P, Romy-Penabad Z, et al. Proof-of-concept study demonstrating the pathogenicity of affinity-purified IgG antibodies directed to domain I of beta2-glycoprotein I in a mouse model of anti-phospholipid antibody-induced thrombosis. *Rheumatology (Oxford)* 2015; **54**(4): 722-7.
6. de Laat B, Derksen R, van Lummel M, Pennings MTT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta(2)-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* 2006; **107**(5): 1916-24.
7. Çetin. A, van Os GMA, Morgelin M, et al. beta(2)-Glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; **116**(8): 1336-43.
8. de Laat B, van Berkel M, Urbanus RT, et al. Immune responses against domain I of beta(2)-glycoprotein I are driven by conformational changes: domain I of beta(2)-glycoprotein I harbors a cryptic immunogenic epitope. *Arthritis & Rheumatology* 2011; **63**(12): 3960-8.
9. Dienava-Verdoold I, Boon-Spijker MG, de Groot PG, et al. Patient-derived monoclonal antibodies directed towards beta(2) glycoprotein-1 display lupus anticoagulant activity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011; **9**(4): 738-47.
10. de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005; **105**(4): 1540-5.
11. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2009; **7**(11): 1767-73.